抗生素对仔猪肠道微生物的影响[1]

刘　颖[1]　王海斌[2]　周　刚[3]　霍永久[1]　董　丽[1]　王海飞[1]　包文斌[1]　喻礼怀[1*]

（1.扬州大学动物科学与技术学院，扬州 225000；2.太仓市金诸农业发展有限公司，太仓 215400；3.江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所，淮安 223001）

摘　要：本研究旨在从肠道微生物的角度探究抗生素的作用机制，为今后绿色抗生素替代品添加剂的研究提供理论基础和参考。试验选用 6 头 30 日龄的杜×长×大三元杂交去势公猪，随机分为 2 组，分别为基础饲粮组（不添加抗生素）和抗生素组（基础饲粮中添加 0.12%复合抗生素），每组 3 个重重复，每个重复 1 头猪。试验期为 35 d。结果表明：抗生素组肠道微生物物种多样性较基础饲粮组更为丰富；抗生素组厚壁菌门（Firmicute）/拟杆菌门（Bacteroidetes）（F/B）比例较高，因此添加抗生素有利于仔猪体内脂肪的贮存；从肠道微生物的角度考虑，抗生素可能是通过促进 *L7A_E11*、*Flexispira*、粪球菌属（*Coprococcus*）等菌属，抑制光岗菌属（*Mitsuokella*）、巨球菌属（*Megasphaera*）、柔嫩菌属（*Faecalibacterium*）等菌属从而发挥预防疾病、提高成活率和促进生长的作用；使用 PICRUSt 进行功能预测，抗生素在脂类生物合成蛋白质、甲烷代谢、转运蛋白、转录因子、转录机制、RNA 转运和脂肪酸生物合成等通路中发挥了重要的作用。由此可见，抗生素可以通过调节仔猪肠道微生物，加速仔猪体内脂肪的贮存，加速断奶仔猪对粗纤维的降解作用，促进短链脂肪酸的生成，从而发挥预防疾病、提高成活率和促进生长等作用。

关键词：猪；16S rRNA；抗生素；肠道微生物

中图分类号：S828　　　　文献标识码：　　　　文章编号：

在过去的几十年，抗生素在畜牧业中对于治疗疾病、预防疾病、促进生长、提高饲料转化效率等方面效果显著[1-2]，对养殖业的发展起到巨大的推动作用。然而近年有关抗生素的副作用，例如长期饲喂抗生素会导致抗生素耐药基因、耐药菌株的增加，抗生素在亚抑菌浓度下会调控细菌基因表达以及畜禽内源性感染和二重感染等问题引起了人们对抗生素使用的重视[3]。美国传染病学会（infectious disease society of America）已经建议美国政府限制抗

收稿日期：2017-02-10

基金项目：江苏省普通高校学术研究生科研创新计划项目（KYZZ16_0495）；江苏省苏北科技专项（BN2016078，BN2016095）

作者简介：刘　颖（1990—），女，江苏淮安人，博士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：yddkly@163.com

*通信作者：喻礼怀，副教授，硕士生导师，E-mail：lhyu@yzu.edu.cn

生素在农业方面的使用[4]，欧盟也已经禁止用抗生素促进动物生长[5]。然而在国内，在现代以及传统农业结合的生产方式下由抗生素带来的成本效益，使得众多国内的畜牧行业不得不坚持使用抗生素。

抗生素的作用效果明显，目前人们认可的其抗菌机制主要是抗生素能抑制细菌胞壁合成、损害细菌胞浆膜、抑制细菌蛋白合成、抑制核酸合成等。有关抗生素促生长的作用机制研究也很多，Francois[6]和 Visek[7]认为，抗生素可以控制动物的亚临床感染，降低对动物生长有抑制作用的微生物代谢产物，降低微生物对宿主动物的养分竞争，使动物肠壁变薄，促进营养物质吸收，从而促进生长。也有研究表明，抗生素可以减少胃肠道乳酸杆菌的数量从而促进动物对营养物质的消化吸收[8]。Rosen[9]总结认为，抗生素有可能促进有益菌的生长，从而抑制有害菌的生长。Dibner 等[10]研究认为，肠道微生物可竞争抵御致病菌和其他微生物在肠道中的定植，激活宿主肠道防御体系，对宿主既具有营养作用，也会与宿主争夺营养物质。因此不难看出，抗生素对肠道微生物的影响在促生长机制中占有重要地位，许多学者的研究也证明了这一点。然而目前国内有关抗生素对肠道微生物的影响研究大多使用平板计数法，只能对极少数的微生物或者某些感兴趣的微生物进行检测。随着 PCR 技术的出现及核酸研究技术的不断完善，16s rRNA 基因检测技术已成为病原菌检测和鉴定的一种强有力工具。

肠道微生物是一个庞大且动态的生态系统，随着研究的深入，肠道微生物不仅可以产生个体生命活动中必不可少的产物，对病原体形成一个屏障，而且在肠道形态、免疫、消化、调控宿主基因表达方面发挥着重要的作用[11-12]。肠道微生物可以协助宿主消化代谢、合成维生素、病原体异位以及促进免疫系统成熟[13-14]。已经有报导证实，人类疾病，如肥胖、糖尿病、肠道炎症疾病等，都与肠道微生物的变化密切相关[15-18]。对于猪而言，肠道微生物对猪胃肠道免疫系统的发展有重要的促进作用，同时也和腹泻密切相关[19-20]。养分有效性、pH、氧化还原电位以及肠道的蠕动都会影响动物肠道微生物的组成[21]，对有益肠道微生物群的干扰是抗生素的一个潜在的作用。研究抗生素对微生物群落的影响对全面了解饲用抗生素带来的好处和后果十分重要。因此，本文利用 16s rRNA 技术对比添加抗生素和不添加抗生素的仔猪肠道菌群组成，旨在从肠道微生物的角度再次探究抗生素的作用机制，为绿色抗生素替代品的研究提供理论基础和参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试验设计

试验所用抗生素为复合抗生素，即杆菌肽锌与黏杆菌素以 5：1 混合。

试验在江苏省江阴定山猪场进行。试验选取 6 头 30 日龄的杜×长×大三元杂交去势公猪，随机分为 2 组，分别为基础饲粮组（不添加抗生素）和抗生素组（基础饲粮中添加 0.12%复合抗生素），每组 3 个重复，每个重复 1 头猪。试验期为 35 d，每天 08:00 和 16:00 各饲喂 1 次，自由采食和饮水。每头猪按猪场规定接种常规疫苗，猪舍每天打扫 2 次，定期消毒。基础饲粮为粉状配合饲料，参照 NRC（2012）猪营养需要量配制。基础饲粮组成及营养水平见表 1。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis)　　%

项目 Items	
原料 Ingredients	含量 Content
玉米 Corn	62.00
豆粕 Soybean meal	25.00
麦麸 Wheat bran	8.00
预混料 Premix[1)]	5.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]	
消化能 Digestible energy/(MJ/kg)	13.05
粗蛋白质 Crude protein	17.41
灰分 Ash	4.51
钙 Calcium	0.61
总磷 Total phosphorus	0.68
速效磷 Available phosphorus	0.35
赖氨酸 Lysine	0.99
蛋氨酸 Methionine	0.39

1) 每千克预混料含 One kg premix contained: VA 1 125 000 IU，VD_3 250 000 IU，VE 2 000 mg，VK_3 204 mg，VB_1 207 mg，VB_2 600 mg，VB_6 246 mg，VB_{12} 2.5 mg，烟酸 nicotinic acid 2475 mg，泛酸钙 calcium pantothenate 1 350 mg，叶酸 folic acid 120 mg，生物素 biotin 5 mg，硫酸铜 copper sulfate 19 500 mg，硫酸亚铁 ferrous sulfate 22 500 mg，硫酸锌 zinc sulfate 14 145 mg，硫酸锰 manganese sulfate 4 800 mg，碘酸钙 calcium iodate （5%） 100 mg，亚希酸钠 sodium selenite （1%） 33 mg，氯化钴 cobalt chloride （1%） 5 mg。

2) 营养水平为计算值。Nutrient levels were calculated values.

1.2　屠宰与样品采集

在试验的最后 1 d（仔猪 65 日龄），将 6 头试验猪全部屠宰，打开腹腔，分离结肠，采取结肠食糜于 1.5 mL 灭菌冻存管，迅速置于液氮保存，用来测定微生物组成。

1.3　结肠食糜微生物区系分析

采用微生物 DNA 抽提试剂盒（德国，QIAGEN 公司）提取 100 mg 样品基因组 DNA，具体步骤按说明书操作。利用 Thermo NanoDrop 2000 紫外微量分光光度计（美国）和 1%琼脂糖凝胶电泳进行总 DNA 质检。将提取的 DNA 作为模板，PCR 扩增 16S rDNA V3~V4 可变区。引物序列为上游：338F 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'；下游：806R 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。在通用引物的 5'端加上适合 HiSeq2500 PE250 测序的 index 序列和接头序列，完成特异性引物的设计。PCR 扩增体系（20 μL）：5×FastPfu Buffer 4 μL，2.5 mmol/L dNTPs 2 μL，上、下游引物（5 μmol/L）各 0.8 μL，FastPfu Polymerase 0.4 μL，DNA 模板 10 ng。PCR 扩增条件为：95 ℃2 min，95 ℃30 s，55 ℃30 s，72 ℃30 s，25 个循环，最后 72 ℃延伸 5 min。用 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，并用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒（美国，AXYGEN 公司）切胶回收 PCR 产物。回收后，利用 Thermo NanoDrop 2000 紫外微量分光光度计（美国）和 2%琼脂糖凝胶电泳进行文库质检。根据标准协议使用 Illumina MiSeq 平台进行上机测序。

测序后首先对原始数据进行质控得到 Clean reads，用 Usearch（v7.0.1090）软件对数据进行去嵌合体和聚类的操作，Usearch 聚类时，先将 Reads 按照丰度从大到小排序，通过 97%相似度的标准聚类，得到操作分类单元（operational taxonomic units，OTU），每个 OTU 被认为可代表 1 个物种。接下来对每个样品的 Reads 进行随机抽平处理，并提取对应的 OTU 序列。然后使用 Qiime 软件，做 Alpha 多样性指数的稀释曲线，根据稀释曲线选择合理的抽平参数，利用 Qiime 软件对得到的抽平后的 OTU 进行分析，首先从 OTU 中分别提取 1 条 Read 作为代表序列，使用 RDP 方法，将该代表序列与 16S 数据库比对，从而对每个 OTU 进行物种分类。归类后，根据每个 OTU 中序列的条数，从而得到 OTU 丰度表，最后根据该 OTU 丰度表进行后续分析。

1.4 数据统计与分析

本研究中组间显著性差异分析是通过统计学的方法检验 2 组样品间微生物群落丰度的差异，并使用伪发现率（false discovery rate，FDR）评估差异的显著性。从检验结果中，可以筛选出导致 2 组样品组成差异的物种。本分析分别在门、纲、目、科、属、种分类等级进行组间显著性差异分析。使用 Metastats（http://metastats.cbcb.umd.edu/）软件或者 R（v3.0.3）软件（秩和检验、Fisher.s 精确检验、卡方检验、*t* 检验、方差检验）进行组间显著性差异分析。*P* 值校正通过 R（v3.0.3）软件包中的 p.adjust 进行，校正方法为“BH”（即 Benjamini-CHochberg）。

2 结果与分析

2.1　OTU 及其丰度分析

拼接的 Clean reads 经过优化后，在 97%相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTU，26 个样品共产生 457 个 OTU，个体样本 OTU 统计见表 2，将每个样品的 OTU 个数进行 Venn 分析，展示 OTU 的重叠情况，如图 1 所示，基础饲粮组和抗生素组共有 288 个 OTU，抗生素组的特有 OTU 有 145 个，而基础饲粮组的特有 OTU 只有 24 个。对 2 组中的 OTU 进行 Alpha 多样性分析，图 2 中分别描述了 observed species 指数、chao 指数、ace 指数、shannon 指数以及 simpson 指数，抗生素组在前面 4 个指数中均明显高于基础饲粮组，在最后一个指数中明显低于基础饲粮组，说明抗生素组中的物种更丰富。这也再次验证了图 1 Venn 分析中，抗生素组的特有 OTU 更多的结果。

表 2　样品 OTU 统计

Table 2　The sample's OTU statistics

样品 Sample	Tag 数 The number of Tag	OTU 数 The number of OTU
抗生素 1 Antibiotic 1	12 671	336
抗生素 2 Antibiotic 2	16 152	364
抗生素 3 Antibiotic 3	19 607	373
基础饲粮 1 Basic diet 1	24 046	247
基础饲粮 2 Basic diet 2	14 536	219
基础饲粮 3 Basic diet 3	26 291	233

Tags 数：样品中能和 OTU 代表序列对比上，并且 OTU 具有注释结果的 Tags 的总数。样品中 1,2,3：分组中的 3 个重复个体。

The number of Tag: some sequence of the sample can be matched with OTU representative sequences, and OTU has the annotation results, the total sum of these sequences. 1,2,3 in the sample: three repeats in the group.

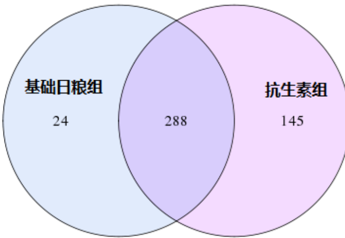
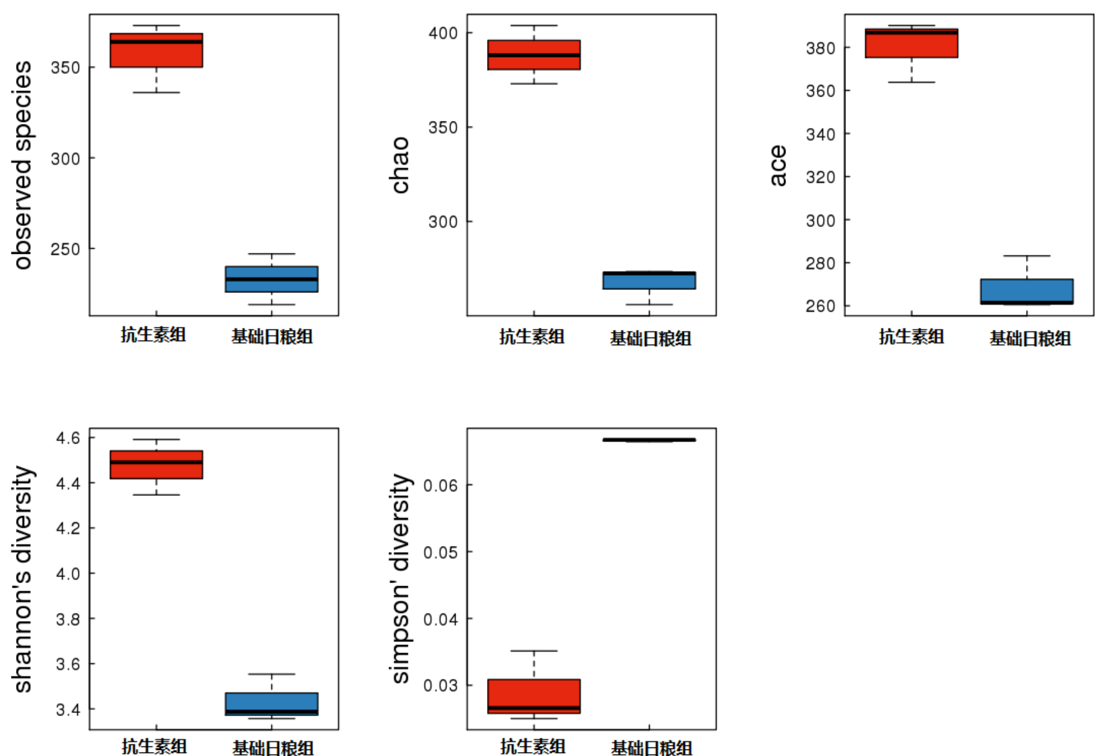


图 1　OTU Venn 分析

Fig.1　The Venn analysis of OTU



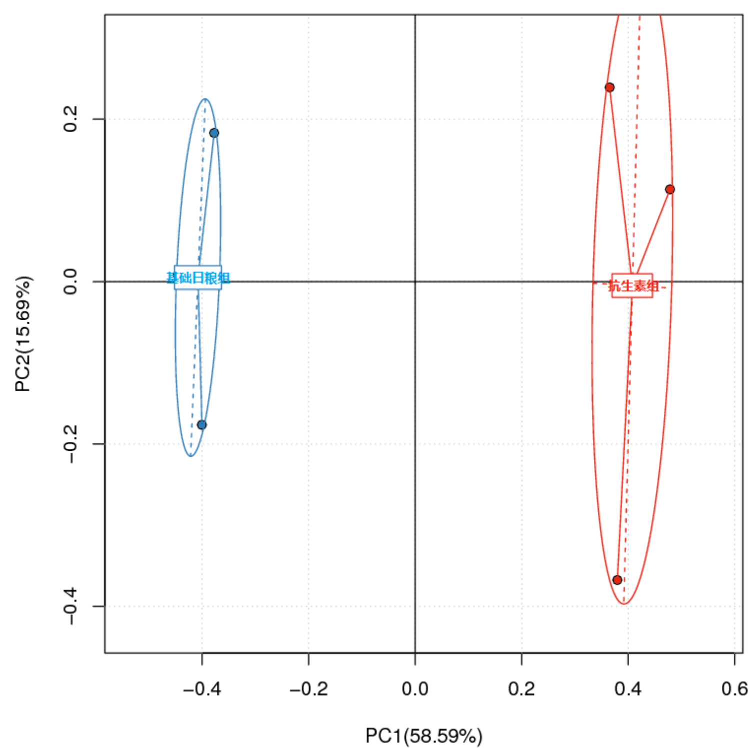
盒形图可以显示 5 个统计量（最小值，第 1 个四分位数，中位数，第 3 个中位数和最大值，即由下到上的 5 条线）。

Five statistics can be displayed in the box diagram (minimum value, the first quartile, median, the third median and maximum value, they are five lines from bottom to top).

图 2 组间 Alpha 多样性盒形图

Fig.2 Alpha diversity box shape among groups

物种的多样性包含 2 个方面，即样品所含物种的丰富程度和均匀度。我们利用每个 OTU 在每个样品的相对丰度，进行 OTU 的主成分分析（principal component analysis，PCA）。在 PCA 中如果 2 个样品距离越近，则表示这 2 个样品的组成越相似，如图 3 所示，在 PCA 中，2 组样品很明显的被区分开，说明 2 组样品的微生物结构及丰度明显不同。OTU Rank 曲线也说明了这个结果，如图 4 所示，抗生素组 3 个个体的横轴长度较基础饲粮组更宽，曲线也较基础饲粮组更平坦，说明抗生素样品中物种组成越丰富，物种均匀度也越高。



图中每个点分别表示每个样品，不同颜色代表样品属于不同的分组。

Each point in the graph represents each sample, and the different colors represent the different samples.

图 3　主成分分析

Fig.3　Principal component analysis

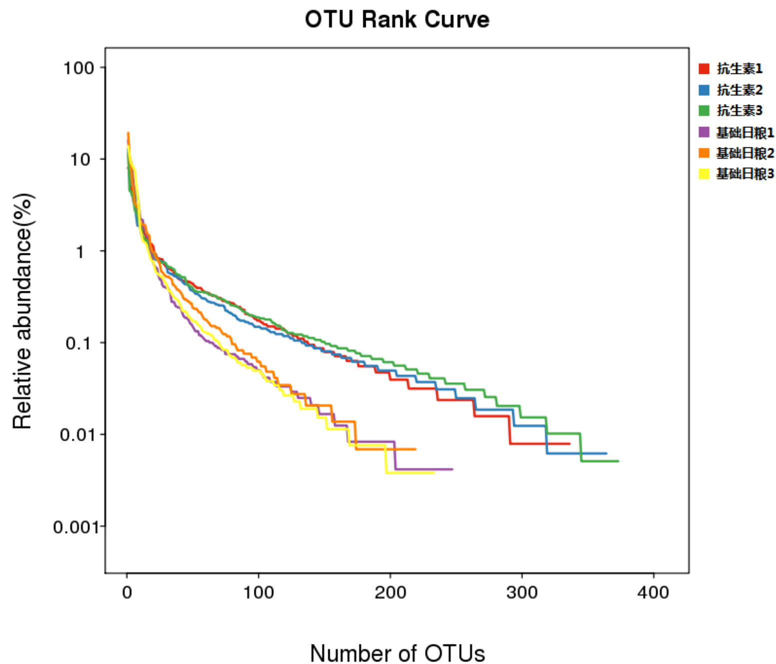


图 4　OTU Rank 曲线图

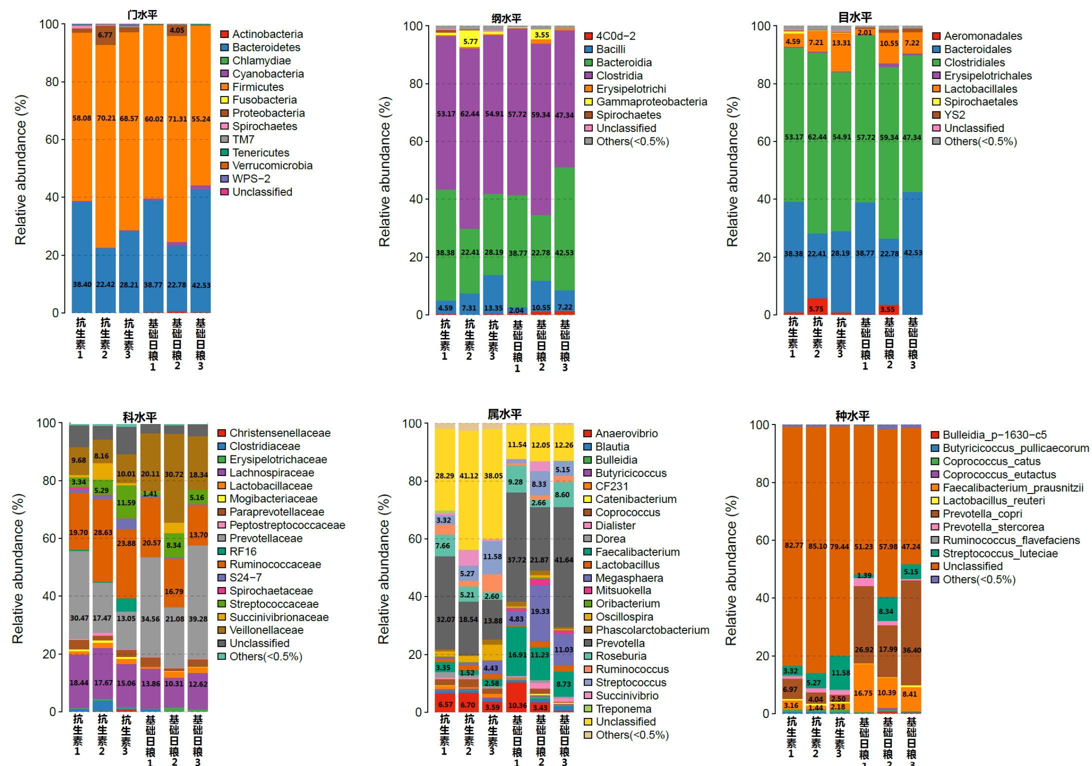
Fig.4　The graph of OTU Rank

2.2　物种及其丰度分析

通过与数据库进行比对，对 OTU 进行物种分类并分别在门、纲、目、科、属、种几个分类等级对各个样品作物种 profiling 柱状图（图 5），结合 LEFSE 分析图（图 6），在门水平上，2 组的微生物组成结构如图 6 所示。根据测序结果，在门水平上，占主导作用的主要是放线菌门（Actinobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、蓝藻门（Cyanobacteria）、厚壁菌门（Firmicutes）、梭杆菌门（Fusobacteria）、变形菌门（Proteobacteria）及螺旋体门（Spirochaetes）等（丰度大于 0.5%）。抗生素组的 Spirochaetes、δ-变形菌纲（Deltaproteobacteria）、β-变形菌(Betaproteobacteria)的丰度显著高于基础饲粮组（$P<0.05$），Actinobacteria 和 Cyanobacteria 的丰度显著低于基础饲粮组（$P<0.05$）。其中 Spirochaetes、Actinobacteria 和 Cyanobacteria 的丰度超过 0.5%。另外在抗生素组中多出了衣原体门（Chlamydiae）、疣微菌门（Verrucomicrobia）和 WPS-2 等。在属水平上，2 组的微生物组成结构如图 6 所示，排在前 5 名的是普雷沃菌属（*Prevotella*）、巨球型菌属（*Megasphaera*）、链球菌属（*Streptococcus*）、柔嫩菌属（*Faecalibacterium*）和厌氧弧菌属（*Anaerovibrio*）。抗生素组的 *L7A_E11*、*Flexispira*、粪球菌属（*Coprococcus*）、毛螺菌属（*Lachnospira*）、*Sphaerochaeta*、密螺旋体属（*Treponema*）、*CF231*、*Parabacteroides*、梭状芽孢杆菌

（*Clostridium*）、*Butyricicoccus* 及颤螺菌属（*Oscillospira*）显著高于基础饲粮组（$P<0.05$），而 *Mitsuokella*、*Megasphaera*、*Faecalibacterium*、*Oribacterium*、丁酸弧菌属（*Butyrivibrio*）、*Collinseella* 及棒状杆菌（*Corynebacterium*）显著低于基础饲粮组（$P<0.05$）。其中 *Faecalibacterium*、巨型球属（*Megasphaera*）、光岗菌属（*Mitsuokella*）、*Oribacterium*、*CF231*、*Coprococcus* 及 *Treponema* 的丰度超过 0.5%。

除此之外，本研究还筛选出在其他水平上既满足丰度大于 0.5%，又在 2 组中差异显著的菌种（$P<0.05$），如在纲水平上只有 4C0d_2 在基础饲粮组显著高于抗生素组（$P<0.05$）；目水平上基础饲粮组的标记微生物为 YS2，抗生素组为螺旋体目（Spirochaetales）；在科水平上基础饲粮组的标记微生物为韦荣球菌科（Veillonellaceae）、抗生素组为 Christensenellaceae、毛螺菌科（Lachnospiraceae）、消化链球菌科（Peptostreptococcaceae）、RF16、S24_7、螺旋体科（Spirochaetaceae）；在种水平上基础饲粮组的标记微生物为柔嫩梭菌群（*Faecalibacterium_prausnitzii*）、人体普氏菌（*prevotella_copri*），而抗生素组为 *Butyricicoccus_pullicaeorum*、*Coprococcus_catus*、生黄瘤胃球菌（*Ruminococcus_flavefaciens*）。物种在不同水平上的热图（图 7）也与之结果一致。

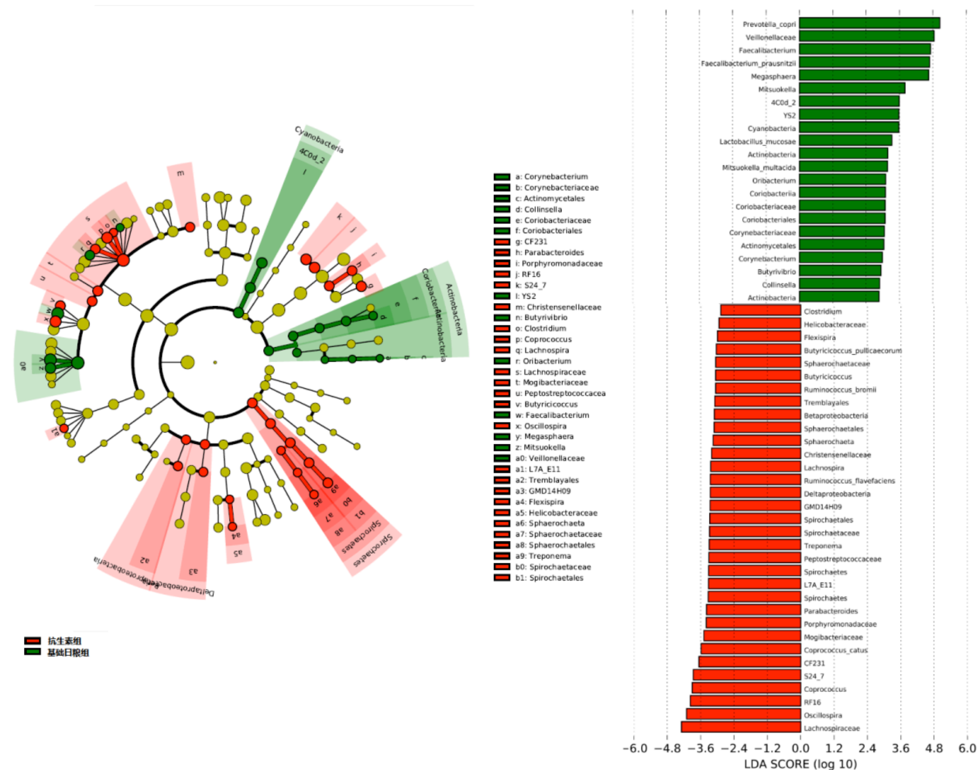


门水平为所有物种的柱状图，从纲水平开始，物种丰度均高于 0.5%其余全部合并成 Others。

Phylum level for all species, starting from the class level, the species richness was higher than 0.5%, which less than 0.5% were all merged into Others.

图 5　样品在不同分类水平中物种 profiling 柱状图

Fig. 5　Species profiling histogram of samples in different classification level



左图中为 LEfSE 聚类树，不同颜色表示不同分组，不同颜色的节点表示在该颜色所代表的分组中起到重要作用的微生物群，一个颜色圈点代表一个 biomarker（组间在丰度上存在显著差异的物种），中间图例为 biomarker 名称。黄色节点表示的是在不同分组中没有起到重要作用的微生物类群。右图为差异显著物种集合（$P<0.05$）。

The left figure is LEfSE cluster tree, different colors represent different groups, and node with different colors represents the microbiota which plays an important role in the group. A color dots represents a biomarker, the middle legend is the name to biomarker. The yellow node represents microorganism that do not play an important role in different groups. The right figure is the significant different species （$P<0.05$）.

图 6　LEFSE 分析图

Fig.6　LEFSE analysis chart

黑框中为 2 组的差异物种。

The different species between the two groups are in the black box.

图 7　不同水平物种丰度热图

Fig. 7　The species abundance infraredimages of different levels

2.3　抗生素组对比基础饲粮组 16S 功能预测

为了比较抗生素组和基础饲粮组中微生物的功能，使用 PICRUSt 对其进行功能预测。如图 8 所示，抗生素组在脂类生物合成蛋白质、甲烷代谢、转运蛋白、转录因子、转录机制、RNA 转运、脂肪酸生物合成等通路中发挥更大的功能。

图 8　16S 功能预测

Fig.8　16S function prediction

3　讨　论

3.1　抗生素对仔猪肠道菌群结构的影响

肠道是一个复杂的微生态系统，在肠道黏膜表面有大量的微生物菌群定植。动物在健康状态下，其肠道微生物处于动态平衡状态，这些长期定植在动物肠道的微生物作为肠道内环境的重要组成部分而存在[22]。肠道微生物菌群通过定植肠道，增加抵抗力，帮助机体防御病原菌的入侵[23]。也可通过增强机体对病原菌的免疫应答和阻止病原菌在肠道的附着，帮助机体免受外来病原菌感染[24]。研究证实，无菌动物比肠道内微生物菌群正常的动物更容易遭受病原菌感染[25-27]。本研究中，肠道微生物的结构确实因为抗生素的添加与否发生了改变，抗生素组的肠道微生物多样性明显高于基础饲粮组。长期以来，人们一直认为饲用抗生素的促生长作用是源于其对肠道微生物的抑制作用。从这里我们可以推测，抗生素可能是通过抑制某些有害菌，从而给更多有益菌增加了繁殖的空间，最终发挥作用。

本试验结果表明，无论在何水平，热图的聚众分析均将 3 个抗生素个体聚在一起，将 3

个基础饲粮个体聚在一起，说明 2 个组内的菌群整体不存在明显差异，而组间差异显著，试验分组合理。在门水平上，无论是基础饲粮组还是抗生素组肠道中的优势菌群都是 Firmicutes 和 Bacteroidetes，值得关注的是 Firmicutes 和 Bacteroidetes 都是发酵多糖的主力军，Ley 等[28]和 Turnbaugh[11]等比较了胖鼠和瘦鼠盲肠内容物的菌群，Lay 等[15]还比较了胖人和瘦人粪便的菌群，结果一致表明胖个体的 Bacteroidetes 丰度较低，而 Firmicutes 的丰度较高，且 Firmicute/Bacteroidetes(F/B)比例在胖个体中偏高。特别是当肠道内 F/B 比例较高，宿主摄取食物中能量的能力会加强，体内脂肪的贮存也会加剧[28]。Bäckhed 等[29]用发现无菌鼠接种多形 Bacteroidetes 后其体脂肪显著增加了 23%，但增加的幅度小于接种盲肠混合微生物的（含有高比例的 Bacteroidetes），这说明 Bacteroidetes 有促进脂肪沉积的作用，这可能与 Bacteroidetes 能分解植物多糖有关，但促进脂肪沉积的效果不如 Firmicutes 高的细菌群体。Firmicutes 与 Bacteroidetes 两者可能存在一种协同的共生关系，高 F/B 比例可能更易促进宿主吸收/储存能量。国内郭秀兰[30]也进一步证实猪脂肪沉积与肠道的 Bacteroidetes 及 F/B 比例相关，他们认为调控肠道微生物可作为控制猪脂肪沉积的途径之一。根据本试验数据，抗生素组的 F/B 比例为 2.21，基础饲粮组的 F/B 比例为 1.79，因此本研究推测添加抗生素有利于仔猪体内脂肪的贮存。

在属水平上，抗生素组的 *L7A_E11*、*Flexispira*、*Coprococcus*、*Lachnospira*、*Sphaerochaeta*、*Treponema*、*CF231*、*Parabacteroides*、*Clostridium*、*Butyricicoccus* 和 *Oscillospira* 显著高于基础饲粮组，而抗生素组的 *Mitsuokella*、*Megasphaera*、*Faecalibacterium*、*Oribacterium*、*Butyrivibrio*、*Collinseella*、*Corynebacterium* 显著低于基础饲粮组。其中 *Treponema*、*Coprococcus*、*Lachnospira* 和 *L7A_E11* 与粗饲料中果胶降解密切相关，能通过促进瘤胃微生物蛋白质合成，进而提高动物生产性能[31]。*Clostridium* 是丁酸产生的主要菌，微生物发酵产生的短链脂肪酸，特别是丁酸，在维持宿主健康和疾病预防上发挥着重要的作用，它可以向宿主结肠上皮细胞提供比葡萄糖更优化的碳源和氮源，不仅能促进肠上皮细胞的生长，加速受损肠黏膜的修复，还能生理性地调控肠上皮细胞的基因表达，有效地抑制肠炎和结肠直肠癌的发生[32]。*Oscillospira* 是一种较难培养的厌氧菌，常见于草食动物肠道中[33]，姬玉娇等[34]发现，*Oscillospira* 为环江香猪结肠内容物中的优势菌属，这与其耐粗饲有很大关系。相反动植物致病性 *Corynebacterium* 会引起家畜各种器官部位的化脓性感染和小麦等农作物的溃疡、萎蔫疾病等[35]。因此抗生素可能是通过对部分有益菌的促进作用，抑制部分有害菌从而发挥自身的作用。

3.2 抗生素组引起的功能通路变化

本研究中用到的抗生素为杆菌肽锌和黏杆菌素。杆菌肽锌属多肽类抗生素，对革兰阳性菌具有杀菌作用，其机制主要为抑制细菌的细菌壁合成，也能与敏感细菌的细胞膜结合，损伤细胞膜的完整性，导致细胞内重要物质外流。它可以促进畜禽生长，提高饲料转换率。黏杆菌素为抗革兰阴性杆菌抗生素，具有杀菌作用，对大多数革兰阴性杆菌有较强抗菌作用，杆菌肽锌与黏杆菌素有协同抗菌作用，作用于仔猪具有预防疾病、提高成活率、促进生长的作用。本研究中，通过 16S 功能预测，发现抗生素组在脂类生物合成蛋白质、甲烷代谢、转运蛋白、转录因子、转录机制、RNA 转运、脂肪酸生物合成等通路中发挥更大的功能。猪肉作为人类最常见的肉类食品之一，脂肪是必不可少的组成成分，皮下脂肪也是肉品加工的重要原料，可以为人类提供必需脂肪酸，并协助脂溶性维生素和胡萝卜素的吸收[36]。对脂类生物合成蛋白质及脂肪酸生物合成等通路的促进作用，有益于仔猪脂肪的合成。甲烷是重要的温室气体，在集约化饲养的猪舍，猪本身的呼吸和舍内粪便会排放大量的温室气体，如何科学有效地处理利用猪场粪便污水，控制环境污染和粪便管理过程中产生的甲烷等温室气体排放，已成为社会关注的问题[37]。加速甲烷气体的代谢可能也是添加抗生素的一个潜在作用。

4 结　论

①抗生素组肠道微生物物种多样性较基础饲粮组更丰富，且 F/B 比例较高，因此添加抗生素有利于仔猪体内脂肪的贮存。

②抗生素可能是通过增加 *L7A_E11*、*Flexispira*、*Coprococcus*、*Lachnospira*、*Sphaerochaeta*、*Treponema*、*CF231*、*Parabacteroides*、*Clostridium*、*Butyricicoccus* 和 *Oscillospira* 等有益菌属，抑制 *Mitsuokella*、*Megasphaera*、*Faecalibacterium*、*Oribacterium*、*Butyrivibrio*、*Collinseella*、*Corynebacterium* 等菌属，从而发挥预防疾病、提高成活率、促进生长的作用。

③通过 16S 功能预测，发现抗生素在脂类生物合成蛋白质、甲烷代谢、转运蛋白、转录因子、转录机制、RNA 转运和脂肪酸生物合成等通路中发挥了重要的功能。

参考文献：

[1] CROMWELL G L.Why and how antibiotics are used in swine production[J].Animal Biotechnology,2002,13(1):7–27.

[2] 曾明富.抗生素在兽医临床上的科学使用[J].乡村科技,2016,6:32–33.

[3] 史自涛,姚焰础,江山,等.粪肠球菌替代抗生素对断奶仔猪生长性能、腹泻率、血液生化指标和免疫器官的影响[J].动物营养学报,2015,27(6):1832–1840.

[4] Infectious Diseases Society of America.The Infectious Diseases Society of America's (IDSA) statement on antibiotic resistance:promoting judicious use of medically important antibiotics in animal agriculture.Before the House Committee on Energy and Commerce Subcommittee on Health[R].Washington,D.C.:House Committee on Energy and Commerce,2010.

[5] US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine.The judicious use of medically important antimicrobial drugs in food-producing animals.Draft guidance No.209[R].Rockville,MD:US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine,2010.

[6] FRANCOIS A C.Mode of action of antibiotics on growth[J].World Review of Nutrition and Dietetics,1961,3:21–64.

[7] VISEK W J.The mode of growth promotion by antibiotics[J].Journal of Animal Science,1978,46(5):1447–1469.

[8] 李同洲,臧素敏,李德发.饲用抗生素对仔猪肠道菌群及肠道物质代谢影响的研究[J].饲料研究,1999(5):3–5.

[9] ROSEN G D.Antibacterials in poultry and pig nutrition[M]//WALLACE R J,CHESSON A.Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding.Weinheim,Germany:VCH Verlagsgesellschaft mbH,1995:143–172.

[10] DIBNER J J,RICHARDS J D.Antibiotic growth promoters in agriculture:history and mode of action[J].Poultry Science,2005,84(4):634–643.

[11] TURNBAUGH P J,LEY R E,MAHOWALD M A,et al.An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J].Nature,2006,444(7122):1027–1031.

[12] GUO X,XIA X,TANG R,et al.Development of a real-time PCR method for *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs[J].Letters in Applied Microbiology,2008,47(5):367–373.

[13] GREEN G L,BROSTOFF J,HUDSPITH B,et al.Molecular characterization of the bacteria adherent to human colorectal mucosa[J].Journal of Applied Microbiology,2006,100(3):460–469.

[14] BIRD A R,CONLON M A,CHRISTOPHERSEN C T,et al.Resistant starch,large bowel fermentation and a broader perspective of prebiotics and probiotics[J].Beneficial Microbes,2010,1(4):423–431.

[15] LEY R E,TURNBAUGH P J,KLEIN S,et al.Microbial ecology:human gut microbes associated with obesity[J].Nature,2006,444(7122):1022–1023.

[16] SEKIROV I,RUSSELL S L,ANTUNES C M,et al.Gut microbiota in health and disease[J].Physiological Reviews,2010,90(3):859–904.

[17] QIN J J,LI Y R,CAI Z M,et al.A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J].Nature,2012,490(7418):55–60.

[18] CONTE M P,SCHIPPA S,ZAMBONI I,et al.Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease[J].Gut,2006,55(12):1760–1767.

[19] LI X Q,ZHU Y H,ZHANG H F,et al.Risks associated with high-dose *Lactobacillus rhamnosus* in an *Escherichia coli* model of piglet diarrhoea:intestinal microbiota and immune imbalances[J].PLoS One,2012,7(7):e40666.

[20] BAUER E,WILLIAMS B A,SMIDT H,et al.Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals[J].Current Issues in Intestinal Microbiology,2006,7(2):35–51.

[21] HAO W L,LEE Y K.Microflora of the gastrointestinal tract:a review[J].Methods in Molecular Biology,2004,268:491–502.

[22] SCHIFFRIN E J,BLUM S.Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa[J].European Journal of Clinical Nutrition,2002,56(Suppl.3):S60-S64.

[23] MAY K D.Granulated lysozyme as an alternative to antibiotics and the use of rice based diets to improve growth performance and immune response in young pigs[D].MSc.Thesis.Arkansas:University of Arkansas,2011.

[24] INOUE R,TSUKAHARA T,NAKANISHI N,et al.Development of the intestinal microbiota in the piglet[J].The Journal of general and applied micribiology,2005,51(4):257–265.

[25] ROTHKOTTER H J,PABST R.Lymphocyte subsets in jejunal and ileal Peyer's patches of normal and gnotobiotic minipigs[J].Immunology,1989,67(1):103–108.

[26] ROTHKÖTTER H J,KIRCHHOFF T,PABST R.Lymphoid and non-lymphoid cells in the epithelium and lamina propria of intestinal mucosa of pigs[J].Gut,1994,35(11):1582–1589.

[27] ROTHKÖTTER H J,MÖLLHOFF S,PABST R.The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs[J].Scandinavian Journal of Immunology,1999,50(1):31–38.

[28] LEY R E,BÄCKHED F,TURNBAUGH P,et al.Obesity alters gut microbial ecology[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2005,102(31):11070–11075.

[29] BÄCKHED F,DING H,WANG T,et al.The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2004,101(44):15718–15723.

[30] 郭秀兰.猪肠道硬壁菌门和拟杆菌门数量的检测及其相对丰度与脂肪沉积的相关性研究

[D].博士学位论文.雅安:四川农业大学,2008.

[31] 刘晶.饲料果胶对瘤胃微生物菌群结构和微生物蛋白合成影响的研究[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2014.

[32] 刘威.一株猪源性乳酸利用、丁酸产生菌的分离和鉴定及其体外代谢特性的初步研究[D].硕士学位论文.南京:南京农业大学,2007.

[33] MACKIE R I,AMINOV R I,HU W P,et al.Ecology of uncultivated *Oscillospira* species in the rumen of cattle,sheep,and reindeer as assessed by microscopy and molecular approaches[J].Applied and Environmental Microbiology,2003,69(11):6808–6815.

[34] 姬玉娇,祝倩,耿梅梅,等.高、低营养水平饲粮对环江香猪结肠菌群结构及代谢物的影响[J].微生物学通报.2016,43(7):1650–1659.

[35] 仝佳.产丙酮酸棒状杆菌的发现、生物学特性及应用性研究[D].博士学位论文.镇江:江苏大学,2010.

[36] 房正国.不同脂肪来源的日粮对仔猪肠道发育及肠道微生物区系的影响[D].硕士学位论文.南京:南京农业大学,2012.

[37] 张路寒,韩冶.浅谈畜禽粪便污染的危害与处理[J].中国畜禽种业,2010(6):40–41.

Effects of Antibiotics on Intestinal Microorganisms of Piglets

LIU Ying[1] WANG Haibin[2] ZHOU Gang[3] HUO Yongjiu[1] DONG Li[1] WANG Haifei[1] BAO Wenbin[1] YU Lihuai[1*]

(1. *College of Animal Science and Technology*，*Yangzhou University*, *Yangzhou* 225000*, China*; 2. *Taicang JinChu Agricultural Development Co*., *Ltd.*, *Taicang* 215400*, China*; 3. *Huaiyin Agricultural Science Research Institute of Jiangsu Xuhuai Region*, *Huai'an* 223001, *China)*

Abstract: The experiment was aimed to explore the mechanism of antibiotics from the perspective of intestinal microbes, and to provide theoretical basis and reference for the future research of green antibiotic alternative. Six Duroc×Landrace×Yorkshire crossbred castrated boars pigs at 30 days of age were selected, and randomly divided into two groups: basal diet group (without antibiotic) and antibiotic group (basal diet supplemented with 0.12% compound antibiotics), each group contained 3 replicates and 1 pigs in each replicat. The experimental lasted for 35 days. The results showed that the intestinal microbial species diversity of antibiotic group was more than that of the basal diet group; the ratio of Firmicute/Bacteroidetes（F/B） of antibiotic group was higher than basal diet group, therefore, the addition of antibiotics was conducive to the storage of fat in piglets; from the perspective of intestinal microflora, antibiotics may through promoting *L7A_E11, Flexispira* and *Coprococcus* et al. and inhibiting *Mitsuokella, Megasphaera* and *Faecalibacterium* et al. to prevent disease, improve survival rate and promote growth; using PICRUSt to predict the function, antibiotic played an important role in lipid biosynthesis protein, methane metabolism, transport protein, transcription factor, transcription mechanism, RNA transport, fatty acid biosynthesis and other pass way. In conclusion, antibiotics can through regulate intestinal microflora of piglets to accelerate fat storage, accelerate the degradation of coarse fiber in piglets, promote the production of short chain fatty acids, and ultimately help to prevent disease, improve survival rate and promote growth.

Key words: pigs; 16S rRNA; antibiotic; intestinal microbes

*Corresponding author, associate professor, E-mail: lhyu@yzu.edu.cn　　（责任编辑　武海龙）